

PCT/EP 99/07604
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 99

40704



REC'D 09 DEC 1999

WIPO

PCT

ESU

EP 99 / 7604 **Bescheinigung**

Herr Dr. Christian. R o s e n m u n d und Herr Sebastian R u s s o , beide in
Göttingen/Deutschland, haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Pharmakologisches Werkzeug zur Identifizierung und Charakterisierung
von Substanzen, welche an Glutamatrezeptoren vom
 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionat (AMPA)-Typ wirken"

am 13. Oktober 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
G 01 N 27/26 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 5. November 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Aktenzeichen: 198 47 064.9

Seiler

14.10.98 15.11.98

MAX-PLANCK-INSTITUTE FÜR BIOPHYSIKALISCHE CHEMIE
KARL-FRIEDRICH-BONHOEFFER-INSTITUT
Abteilung Membranbiophysik



Dr. C. Rosenmund, MPI für biophysikalische Chemie, 37077 Göttingen
Sebastian Russo, MPI für biophysikalische Chemie, 37077 Göttingen

An das
Deutsche Patentamt

80297 München

Fax: 089/2195-2221

Christian Rosenmund, PhD
Am Faßberg 37077 Göttingen
P.O. Box 28 41 / 37018 Göttingen
Tel. +49 551/201-167
Fax +49 551/201-1688
E-Mail crosenm@gwdg.de
13.10.1998

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit wird die Erteilung eines Patents für die in den beiligenden Unterlagen beschriebene Erfindung beantragt.

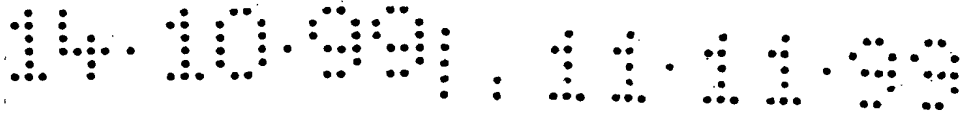
Die Anmeldung soll zur Sicherung einer Priorität dienen.

Göttingen, den 13.10.98


Dr. Christian Rosenmund


Sebastian Russo

Anlagen: 2 Seiten Text, 1 Seite Abbildungen, 1 Seite Abbildungserklärungen



Anlage Seite 1, Antrag vom 13.10.1998

- 1.) Die Erfindung dient als pharmakologisches Werkzeug zur Identifizierung und Charakterisierung von Substanzen, welche an Glutamatrezeptoren vom α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionat (AMPA)-Typ wirken. Nach Expressierung eines AMPA-Rezeptormutanten in Zelllinien oder in Oozyten von *Xenopus laevis* kann die pharmakologische Wirksamkeit einer Substanz durch elektrophysiologische Messung von Substanz-induzierten, bzw. Substanz-inhibierten Glutamat-Strömen bestimmt werden.
- 2.) Es handelt sich bei unserer Erfindung um eine spezifische Punktmutation (L497Y) in dem AMPA-Rezeptor GluR1_{mp}, welche die sonst typische Desensitisierung des nativen Kanals komplett blockt. Andere Eigenschaften des Rezeptors sind durch die Mutation nicht signifikant verändert. AMPA-Rezeptoren (GluR1-4) gehören zur Familie der ionotropen Glutamatrezeptoren, welche sich hauptsächlich auf der postsynaptischen Seite von Nervenzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) befinden. Glutamat ist der wichtigste Neurotransmitter des ZNS und daher spielen die AMPA-Kanalfunktionen eine zentrale Rolle für die neuronale Kommunikation.
- 3.) Desensitisierung der AMPA-Rezeptoren schützt die postsynaptische Zelle vor Übererregung nach exzessiver Glutamatausschüttung, wie sie unter anoxischen oder traumatischen Bedingungen im Gehirn auftreten könnte. Diese schnelle Desensitisierung (Zeitkonstante ca. 1-13 ms mit einer Inhibition des Stromes von 93%-99%) erschwert den experimentellen Zugang zur Messung von Kanalaktivität und in Folge auch zu einfachen pharmakologischen Untersuchungen.
- 4.) Während bei nativen Rezeptoren die schnelle Desensitisierung eine Bestimmung der eigentlichen Spitzenantwort fast unmöglich macht, werden bei einem nicht-desensitisierenden Kanal immer die maximalen Stromantworten in Relation zur eingesetzten Agonistenkonzentration gemessen, so daß Dosis-Wirkungskurven leichter und genauer bestimmbar sind. Des weiteren läßt sich von dem Aktivierungsmuster des Kanals direkt auf die Klassifizierung der zu testenden Substanz schließen. Antagonisten, partielle Antagonisten und volle Agonisten lassen sich klar unterscheiden.
- 5.) Während desensitisierende Rezeptoren in der Regel eine Erholungsphase haben, sog. Resensitisierung, braucht diese Versuchseinschränkung bei der vorgestellten Punktmutation nicht berücksichtigt werden. Substanzen können beliebig schnell und zu jedem Zeitpunkt des Versuches appliziert werden, ohne das eine Abnahme der Aktivität zu befürchten wäre (siehe Abb.C). Der GluR1-Rezeptor und sein Mutant haben im Vergleich zu anderen AMPA-Rezeptoren die höchste Affinität, so daß selbst schon bei 100 μ M Glutamat von gesättigten Konzentrationen ausgegangen werden kann (Abb. 1D). Dies erleichtert die Messungen an Froschoozyten, da dort nur submillimolare Glutamatkonzentrationen eingesetzt werden können.

14.10.98 19:44 FAXG3 Nr. 62981 von NVS:FAXG3.21/005512011688 (Seite 3 von 5)

Anlage Seite 2, Antrag vom 13.10.1998

- 7.) Die Punktmutationen wurden auf PCR-Basis nach dem QuickChange Mutageneseverfahren (Stratagene) hergestellt, anschließend in GluR1-pCDNA3 oder -pGEMHE Expressionsvektoren überführt. Expressierung kann damit entweder in Säugetierzelllinien oder Froschoozyten erfolgen. Die Expressierung durch transiente oder permanente Transfektion von HEK-Zellen, bzw. RNA-Injektion in Oozyten, ist ein etabliertes Verfahren und hat sich gerade bei der Charakterisierung von Membranproteinen als sehr erfolgreich bewiesen.
- 8.) GenBank accession number: X17184 GluR1 der Ratte (Hollmann et al., Nature 342, 643, 1989). Die Aminosäurenummerierung beginnt am Methionin des „open reading frame“. Die Aminosäure an Position 497 ist von L (Lysin) zu Y (Thyrosin) mutiert worden. Andere aromatische Aminosäuren an dieser Position haben den gleichen Effekt gezeigt und sollen damit in diesem Patent beinhaltet sein.

14.10.99 11.11.99

A)

Typische Antwort auf die Applikation von 10 mM L-Glutamat zu einem nativen, homologen GluR1_{np} Rezeptors. Die Aufnahme wurde in out-side-out-patch-Konfiguration von transient transfizierten HEK-Zellen gemacht.

Der schwarze Balke gibt den Zeitraum an, in welchem Glutamat appliziert wurde.

Beachten Sie die schnelle Desensitisierung in Anwesenheit des Agonisten.

Die schwarze Skizze zeigt schematisch die Primärstruktur des Proteins mit den Transmembranregionen (M1, M2 und M3) als senkrechte, kleine Balken.

B)

Typische Antwort auf eine Applikation von 10 mM L-Glutamat des nicht-desensitierenden AMPA-Kanals GluR1_{np} (L497Y).

Die Aufnahme wurde in out-side-out-patch-Konfiguration von transient transfizierten HEK-Zellen gemacht. Man sieht die vollständige Aktivierung des Kanals während der Applikation des Agonisten.

Innerhalb der Skizze ist die Lokalisation der Punktmutation als weißer Strich gekennzeichnet.

C)

Die Abbildung zeigt die Stromspur zur Erstellung einer Glutamat -Dosis-Wirkungskurve vom GluR1_{np} (L497Y) Rezeptor.

Die Ganzzelleableitung wurde mit der patch-clamp-Methode von transient transfizierten HEK-Zellen gemacht.

Die eingesetzten Konzentrationen sind über den Balken angegeben.

D)

Der Graph zeigt die dosisabhängige Stromantwort des nicht-desensitierenden AMPA-Kanals GluR1_{np} (L497Y) auf L-Quisqualat (schwarze Kreise) und L-Glutamat (weiße Quadrate), normalisiert zur Spitzenantwort.

Beachten Sie die Genauigkeit der Messmethode anhand der Fehlerbalken.

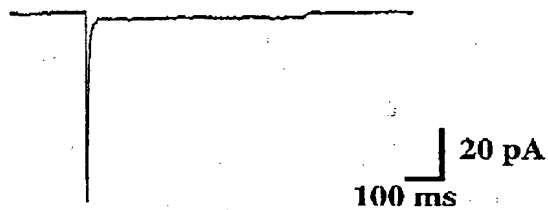
Die Daten wurden wie in C) dargestellt gewonnen.

14.10.98 15:11:59

A

GluR1_{flip}

Glutamate, 10 mM

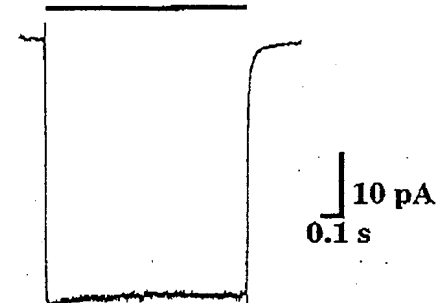


B

R1(L497Y)

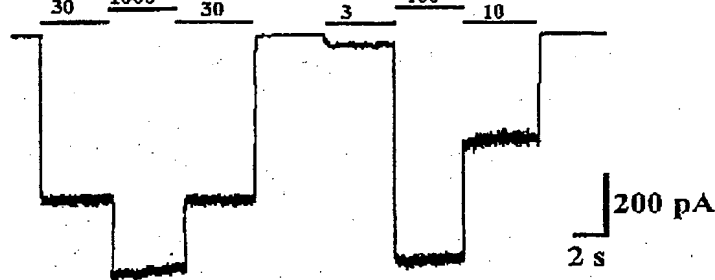


Glutamate, 10 mM



C

R1(L497Y)

Glutamate [μ M]

D

